

Campus Científicos de Verano 2014

Proyecto

¿QUIÉN ES QUIÉN?
GENOTIPADO DE PARENTALES
Y DESCENDENCIA EN ESPECIES
DE ACUICULTURA.

Alumno _____

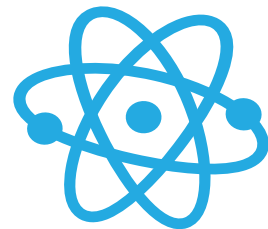
CAMPUS DO MAR
KNOWLEDGE IN DEPTH

Campus Científicos de Verano 2014

PLANIFICACIÓN SEMANAL CAMPUS CIENTÍFICOS VERANO 2014

	LUNES	MARTES	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES	SÁBADO	DOMINGO
8:00	DESAYUNO						
9:00	Recepción y conferencia	DESAYUNO	DESAYUNO	DESAYUNO	DESAYUNO	DESAYUNO	
10:00	Trabajo de investigación	Trabajo de investigación	Trabajo de investigación	Visita a Viana do Castelo	Conclusiones + presentación de resultados de los proyectos	Tiempo libre	
11:00							
12:00							
13:00							
14:00	COMIDA	COMIDA	COMIDA		COMIDA		
15:00							
16:00	Trabajo de investigación	Visita al Museo do Mar de Galicia	Taller TIC		Tarde libre en Vigo		
17:00			Preparación Presentación de resultados				
18:00		Playa	Tiempo libre				
19:00	Tiempo libre						
20:00							
21:00	CENA	CENA	CENA	CENA			

¿QUIÉN ES QUIÉN? GENOTIPADO DE PARENTALES Y DESCENDENCIA EN ESPECIES DE ACUICULTURA.



Equipo científico: Montse Pérez: Científico Titular de OPIS, Manuel Nande: Ayudante Técnico.

Instituto Español de Oceanografía. Centro Oceanográfico de Vigo. Planta de Cultivos.

INTRODUCCIÓN

La domesticación de animales y de plantas (cultivo) es el proceso por el cual una población de una determinada especie es sometida a selección y a consecuencia de ello **pierde, adquiere o desarrolla**, ciertos caracteres morfológicos, fisiológicos o de comportamiento, que son heredables. Centrándonos en la domesticación de especies en acuicultura, una de las disciplinas más importantes es la genética. La genética aporta información crucial, a la hora de iniciar y lograr el cultivo sostenible de las especies. Es de utilidad en los siguientes aspectos: i) la identificación o genotipado de los individuos, que es la base de los estudios genéticos posteriores, ii) el análisis del pedigrí, para determinar quiénes son los progenitores de un individuo, iii) la caracterización genética de stocks de reproductores, iv) la caracterización genética de las poblaciones naturales, selección y mejora genética y estudios de trazabilidad.

Para profundizar sobre esto, os recomiendo leer el artículo adjunto (Genética en Acuicultura, Fundación OESA)

El Lenguado senegalés

La especie cultivada con la que vamos a trabajar en este proyecto es *Solea senegalensis*, o lenguado senegalés. Se encuentra en el mar Mediterráneo y en las costas atlánticas desde el golfo de Vizcaya hasta Senegal. Esta especie se ha sometido a cría intensiva en acuicultura por su alto valor comercial y el rápido desarrollo de los huevos. A pesar de estas características favorables, todavía hay problemas para su cultivo, fundamentalmente por causas inherentes a la especie como las dificultades que presenta su reproducción en cautividad.



Figura 1. Distribución geográfica de *S. senegalensis* (color púrpura) según Porta et al. (2006).

Reproducción de *Solea senegalensis*

El cultivo del lenguado se basa, al igual que en el resto de especies, en la estabulación de peces salvajes obtenidos del medio marino para la formación de lotes de reproductores, que se reproducen generando larvas de la generación F1. La reproducción del lenguado senegalés en cautividad se comenzó a estudiar en la década de los 80 y continúa hoy en día (Rodríguez et al., 1982). Hasta el momento, se ha demostrado que en lenguados existe una gran influencia de las pautas de cortejo sexual y la acción de feromonas sobre el proceso de fecundación en el tanque (Agulleiro, 2008). En el caso del lenguado senegalés, los peces F1 suelen presentar problemas reproductivos en edad adulta, mientras que las hembras F1 son capaces de producir huevos fertilizados con puestas espontáneas siempre y cuando estén acompañadas por machos salvajes (Mañanós, 2011). Además, se ha demostrado que los machos F1 no tienen un comportamiento de cortejo normal (Carazo et al., 2009).

La causa de este comportamiento anómalo continua siendo un enigma y por esta razón, la investigación sobre este tema es de suma importancia para solucionar este cuello de botella en el cultivo de *S. senegalensis*.

Este problema afecta negativamente a su viabilidad y a la rentabilidad económica como cultivo a escala industrial, pues impide la producción de huevos y larvas de manera controlada y que se pueda considerar realmente cerrado el ciclo vital de la especie en cautividad.

Se ha descrito la fisiología reproductiva en cautividad y se han ajustado protocolos específicos de manipulación ambiental (fotoperiodo y temperatura), así como tratamientos hormonales, con resultados positivos en cuanto a la estimulación de la ovulación y espermiación, e incluso al incremento de la producción de huevos, pero que resultan ser inviables. Hasta la fecha no se han obtenido larvas F2, excepto utilizando técnicas de fertilización artificial con esperma criopreservado (Rasines et al., 2012).

En algunas zonas del sur de España y Portugal se han conseguido puestas viables procedentes de los reproductores salvajes estabulados a lo largo de varios años, aunque se producen de manera poco predecible (Dinis *et al.*, 1999; Anguis y Cañavate, 2005). Se ha detectado una cierta influencia de la alimentación, obteniéndose mejores resultados de puesta en reproductores alimentados con comida natural que los que se alimentan con pienso comercial (Norambuena, 2009).

En la actualidad, los alevines de lenguado senegalés presentan un crecimiento optimizado, pero el factor limitante sigue siendo la ausencia de métodos para el control de la reproducción bajo condiciones de estabulación.

¿QUÉ VAMOS A HACER?

En este proyecto, vamos a identificar a los padres de una puesta de lenguado senegalés obtenida en la planta de cultivos del Centro Oceanográfico de Vigo. Para ello, trabajaremos en varias etapas, que comprenderán:

1. Muestreo de aleta de lenguados para su conservación en alcohol y posterior genotipado.
2. Extracción ADN de lenguados, padres e hijos.
3. Amplificación de unos marcadores genéticos denominados **microsatélites** utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
4. Visualización del resultado de la amplificación en geles de agarosa.
5. Preparación de las muestras para genotipar.
6. Visualizar los genotipos marcados con fluorescencia, utilizando el programa GeneMarker V2.4.0. Lectura de genotipos.
7. Análisis de los datos obtenidos con un programa sencillo de asignación a parentales.
8. Identificación de los individuos heterocigotos y homocigotos, y mediante una sesión demostrativa de aplicación del programa PARENTE.

El objetivo es comprobar la utilidad de la técnica y sus limitaciones para la identificación de los parentales de lenguado. Esperamos que con vuestra implicación en este proyecto descubráis la utilidad que tiene la genética en la acuicultura.

¿PARA QUÉ VAMOS A HACERLO?

Se trata de responder a una sencilla pregunta:

¿Qué tipo de individuos hemos de poner en los tanques de lenguado para que haya puesta?

En todos los centros de cultivo donde se ha intentado, ha habido muchas dificultades para obtener puestas de lenguados nacidos en cautividad (denominados F1, los individuos salvajes son los que provienen de la naturaleza). Como vimos en la introducción, parece existir una relación directa con la ausencia de comportamiento de cortejo en los machos F1. Para comprobar si se trata

de un problema de aprendizaje, en 2010 se prepararon dos tanques con reproductores (Parentales). En uno de ellos se pusieron juntos hembras F1, machos salvajes y machos F1 (denominado T6) y en el otro Hembras salvajes con machos salvajes y machos F1 (denominado T7). En 2011, se obtuvieron puestas espontáneas en ambos tanques, pero únicamente una de las puestas del T6 resultó ser apta para el cultivo. Los ejemplares se mantienen en el Centro Oceanográfico de Vigo (COV), así que muestrearemos su aleta caudal *in vivo* para poder llevar a cabo este proyecto.

Con el método de asignación que vamos a aplicar, trataremos de identificar a los padres de las puestas para establecer el diseño de los tanques de reproductores en el futuro y asegurarnos que vamos a tener puestas.

¿CÓMO VAMOS A HACERLO?

Muestreo de lenguados

Prepararemos tubos eppendorf de 1,5ml con alcohol, tijeras, pinzas, papel y rotuladores indelebles.

En nuestro caso, los parentales ya están muestreados y un trozo de aleta caudal se conserva en alcohol en el laboratorio de biología molecular del COV. La identificación de los individuos se efectúa mediante la lectura de un chip que previamente hemos insertado en su músculo. El número de chip se escribe en el tubo y así se consigue mantener la trazabilidad de los individuos.

Nosotros haremos lo mismo con la descendencia. Para evitar confusiones, sacaremos del tanque un solo ejemplar cada vez. Lo ponemos sobre la mesa de muestreo y lo tapamos con un paño para que permanezca a oscuras mientras hacemos el muestreo. De este modo, el estrés del individuo por estar fuera del agua es menor. Con una tijera cortamos un trozo pequeño de aleta caudal y lo introducimos con pinzas en un tubo eppendorf con alcohol. Lo marcamos con un chip y apuntamos la referencia del chip en el tubo.

Cada uno de vosotros lo hará con un ejemplar. Es extremadamente importante asegurarse de que el código del chip está apuntado correctamente. En caso contrario, los datos obtenidos no servirán para nada, pues no podremos identificar a los individuos.

Extracción del ADN con Chelex 10%

Se utilizarán las muestras de los ejemplares de lenguado de la descendencia que acabamos de muestrear. Las extracciones de ADN se realizarán con el método de resina Chelex 10% (Walsh et al., 1991). Este método es muy sencillo y rápido, por ello se suele utilizar en ciencia forense. Además probaremos la extracción de ADN con un kit comercial y compararemos los resultados.

Cada uno de vosotros va a extraer el ADN del individuo que ha muestreado. El **primer paso** es poner el nombre de la muestra en el tubo. Tomaremos nota en nuestro cuaderno de laboratorio del nombre de la muestra y los datos que consideremos importantes (Cuanto más mejor).

- Introducir un fragmento de tejido en un tubo de 1,5 mL
- Añadir 300µl de Chelex al 10% (caliente a 65°C)
- Añadir 5 µL de proteinasa K (20mg/mL)
- Incubar 1 hora a 55°C y en agitación
- Incubar a 100°C durante 15 minutos
- Dejar enfriar en la meseta
- Centrifugar a 13000 rpm durante 3 min y pasar el sobrenadante a un tubo limpio.
- Guardar la muestra obtenida a 4° C

Si tenemos tiempo probaremos a extraer ADN utilizando algún kit comercial de extracción de los que tenemos en el laboratorio siguiendo el Protocolo de extracción del KIT.

Para la visualización de los fragmentos amplificados realizaremos una **electroforesis en gel de agarosa**. Como seguramente ya sabéis, esta técnica se basa en el principio de separación de moléculas debido a su carga eléctrica y su peso molecular. La carga negativa del ADN debida a los grupos fosfato unidos a los desoxiribonucleótidos, hace que migre hacia el polo positivo cuando se expone a un campo eléctrico. La migración es inversamente proporcional al logaritmo de la longitud de la molécula, pero existe linealidad entre el logaritmo de la movilidad y la concentración de agarosa. El peso molecular es utilizado para inferir el tamaño aproximado de los fragmentos.

Según el tamaño de los fragmentos que queramos separar, hay que tener en cuenta el tipo de agarosa, el porcentaje de agarosa en el gel, el tampón de migración. Además, a cada muestra se le añade un marcador de migración o tampón de carga (TC) que se utiliza para monitorizar la correcta migración de los fragmentos de ADN y para facilitar la carga. Cualquier alteración en el frente de avance puede ser detectada observando el marcador, en nuestro caso, azul de bromofenol. La movilidad depende de la concentración de agarosa y del tampón utilizado.

Marcador de peso molecular

El marcador de peso molecular sirve para calcular la longitud aproximada del ADN problema, por esta razón se carga en los laterales del gel. En el mercado hay una gran variedad de marcadores de peso molecular adecuados a distintos rangos de tamaño, desde ocho pares de bases hasta 20 kb. Suelen construirse mediante digestión del ADN de un fago con distintas combinaciones de enzimas de restricción.

Tinción del ADN con *GreenSafe Premium*

El *GreenSafe Premium* tiene la misma sensibilidad y se usa del mismo modo que el Bromuro de Etidio (BET). La ventaja del *GreenSafe* es que es no es ni mutagénico, ni tóxico ni carcinogénico. Actúa insertándose en los anillos de la molécula de ADN y emite una luz verdosa al ser excitado en la longitud de onda del ultravioleta. De manera que la tinción es simultánea a la migración.

Preparación de geles de agarosa

La agarosa se disuelve en el mismo tampón que se va a utilizar durante la migración, en nuestro caso TAE 1X (Tris Acetato EDTA). El protocolo es el siguiente:

- Pesar 1 g de agarosa en la balanza
- Medir 50 mL de tampón TAE 1x en una probeta
- Mezclar bien y calentar al microondas
- Dejar enfriar la solución hasta 60 ° C
- Añadir 3 µL de *GreenSafe Premium* a la solución y mezclar
- Colocar las gomas y el peine en la bandeja de metacrilato.
- Añadir la solución de agarosa en medio de la bandeja, evitando que se formen burbujas y dejar solidificar durante 20 min.

Carga del gel y migración

Una vez solidificado el gel, se quitan las gomas y el peine y se coloca en la cubeta de electroforesis. Comprobamos el nivel de tampón TAE 1x pues debe cubrir el gel. Las muestras que se van a cargar se preparan en tubos de ensayo de 1.5 ml independientes. La preparación consiste en mezclar 5 µl de cada muestra de ADN extraído con 3 µl de tampón de migración.

Es importante apuntar en nuestro cuaderno de laboratorio el orden de carga antes de empezar, cuando terminemos comprobaremos que hemos cargado correctamente. Ajustar la pipeta a 8 ml y poner una punta blanca. Empezaremos a cargar por el extremo izquierdo del gel, poniendo en la primera calle el marcador de peso molecular, en nuestro caso es un marcador de 100 pb (Hyper Ladder IV de Bioline). Una vez cargado el gel, tapamos y conectamos la cubeta a la fuente de alimentación. Ajustamos el voltaje a 75 voltios. Cuando la banda de azul de bromofenol haya alcanzado los dos tercios del gel, se detiene la migración y se observa a la lámpara ultravioleta.

Hay que tener también especial cuidado con las exposiciones largas a los rayos ultravioleta, mientras se visualizan las bandas de ADN en el gel. Deben de utilizarse obligatoriamente gafas o máscaras protectoras. La exposición del gel a la luz ultravioleta durante mucho tiempo provocará la rotura del ADN.

Además de la visualización del ADN en geles de agarosa y se obtendrá una estima de la cantidad del mismo y su pureza con una medida directa utilizando un NanoDrop.

Al finalizar esta sesión tendremos el ADN listo para poder amplificar por PCR los marcadores genéticos seleccionados.

AMPLIFICACIÓN POR PCR DE MARCADORES MICROSATÉLITES DE LENGUADO

Tenéis una visión esquemática de cómo funciona la amplificación por PCR en la figura 1.

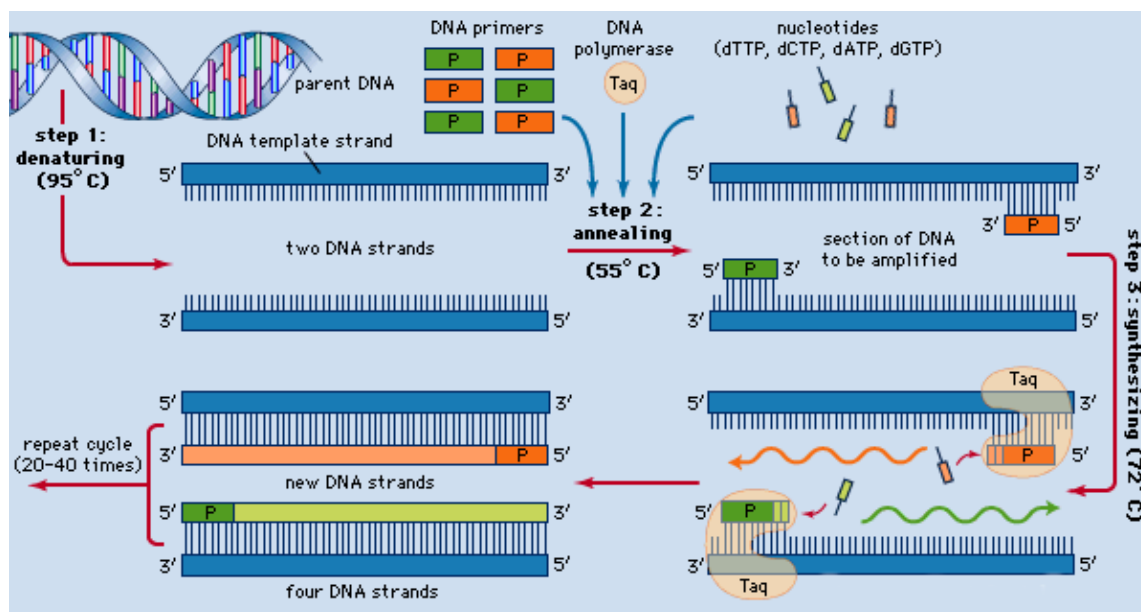


Figura 1.- Esquema de una amplificación por PCR

En este caso, amplificaremos mediante PCR tres marcadores microsatélite específicos para lenguado denominados GATA 38 (Funes et al, 2004) y Sol 13 D y Sol 9A (Porta et al., 2006). Las condiciones de amplificación para los microsatélites las tenéis en la tabla 1.

Nombre	Primers (5'->3')	Unidad repetida	T ^a	MgCl ₂ (mM)	Marcaje
Sol 13D	GATCATTAGAGAGGTCACACGAGC CATGACATCATCGCAGACC	(GT) ₁₂	59	1.5	PET
Sol 9A	GATCCTCTGTGCCACGACGTTGG GATCTGGCCGAGAGCAGATGC	(GT) ₁₂	59	1.5	6-FAM
GATA 38	ATATCATCAGGCAGTAAAACGGTCGCAAATG GCAATCTGCAAACCTGACCACTAGATGCCAGT	(GATA) ₂₀	62	2.0	HEX

Tabla 1. Condiciones de amplificación de los microsatélites seleccionados.

Pero, ¿Qué es un microsatélite?

Los microsatélites, son repeticiones en tándem de 2 a 6 pb. El número de repeticiones consecutivas en una posición genómica en particular varía de individuo a individuo. El **nivel de polimorfismo** de los marcadores genéticos condicionará su posible aplicación para el estudio de relaciones entre individuos.

Y el polimorfismo ¿Qué es?

La variación genética o polimorfismo es la existencia en una población de dos o más formas alélicas (Alelos) en frecuencias apreciables.

Y los alelos...

Son las variantes que observamos para un gen o un marcador genético determinado. En el caso de los microsatélites el número de alelos puede ser muy elevado, cada alelo corresponde a un número de repeticiones concreto-

Junto a las muestras de ADN extraídas por vosotros vamos a utilizar individuos control (controles positivos), es decir aquellos cuyo ADN ha sido previamente extraído y amplificado, para comprobar la fiabilidad del procedimiento.

Para la PCR necesitamos mezclar en un tubo los siguientes elementos: DNA genómico total que actúa como molde, dos oligonucleótidos complementarios de los extremos de la secuencia a amplificar (*primers* o cebadores) uno de ellos marcado con un fluoróforo, mezcla de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) Taq DNA polimerasa y magnesio que actúa como cofactor de la polimerasa. La reacción se realiza en tubos eppendorf de 0,5 ml y en un volumen total de 15 ml que se completa con agua destilada.

Debéis completar la siguiente tabla para determinar la cantidad de cada componente en la PCR

Solución stock	Concentración final	Volumen (ml)
Buffer 10X	1X	
DNTPs NZY (10 mM)	-	0.5
Primer F (forward) (10 mM)	10 pm	
Primer R (reverse) (10 mM)	10 pm	
MgCl ₂ (50 mM)	2 mM	
DNA (50 ng/μl)	100 ng	2 μl
Biotaq (5 U/μl)	1 U	
Agua destilada	1X	

La reacción de amplificación consistirá en un paso de desnaturalización a 95°C durante 10 min seguido de 35 ciclos de (30 s a 95°C + 30 s a xx°C + 40 s a 72°C) + 10 minutos de extensión final a 72°C. Siendo xx la temperatura correspondiente a cada microsatélite. Lo haremos en dos termocicladores de gradiente que tenemos en el laboratorio, uno de ellos de la marca Agilent y el otro marca Eppendorf. Para la visualización de los fragmentos amplificados realizaremos una electroforesis en un gel de agarosa al 2%. Mezclaremos 5 ml del producto de PCR amplificado y 3 ml del tampón de migración. La preparación del gel y la carga se efectuará del mismo modo que antes pero hay que tener en cuenta el cambio en la concentración de agarosa.

OBSERVACIÓN, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Una vez comprobada la correcta amplificación en el gel de agarosa. Se procede a la mezcla de las PCRs de los distintos microsátélites analizados junto a un estándar marcado y formamida desionizada. En nuestro caso el estándar se llama *GeneScan™-500 LIZ Size Standard* y está marcado con el fluoróforo LIZ, de color naranja. Este estándar está diseñado para tallar fragmentos entre 35 y 500 pares de bases y proporciona 16 fragmentos marcados de 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250*, 300, 340, 350, 400, 450, 490 y 500 bases (figura 2).

Vamos a preparar las muestras para genotipar, para ello mezclamos en un tubo eppendorf

	μl
Muestra	0.5 x 3
Formamida	¿?
Fluoróforo	0.25
TOTAL	10

Debéis calcular la cantidad de formamida necesaria para incluir los 3 microsátélites en el mismo tubo.

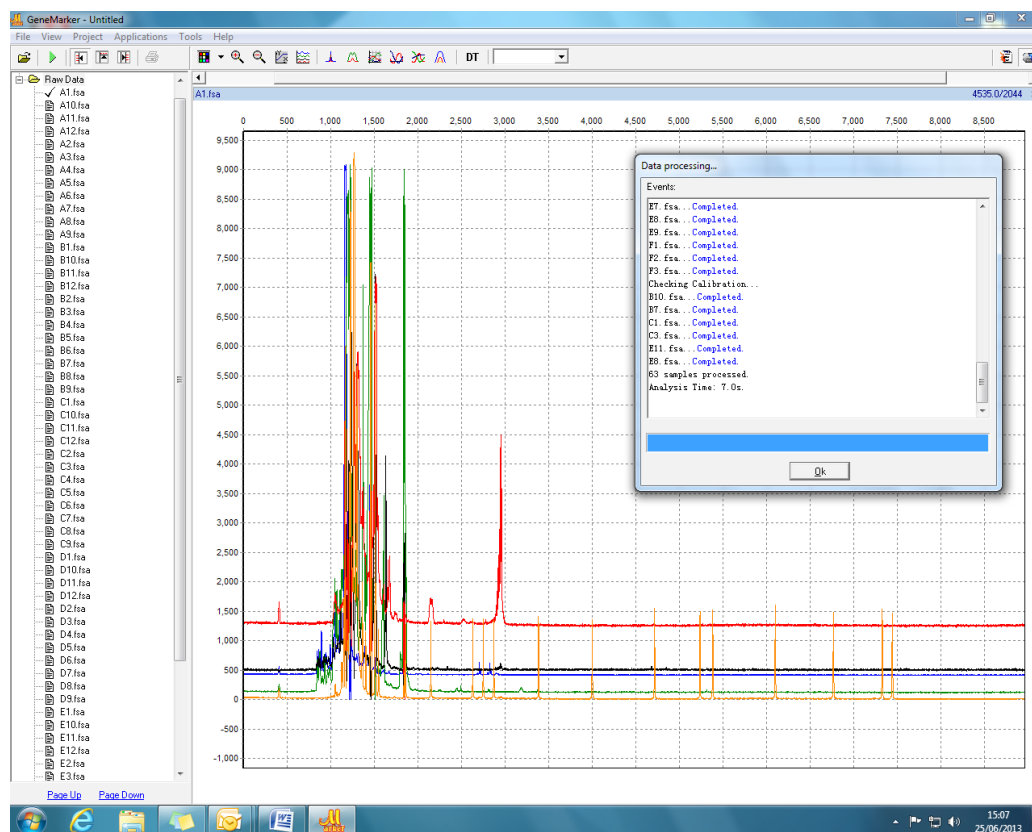


Figura 2.- GeneScan™-500 LIZ Size Standard

Una vez preparadas las muestras las subiremos al servicio de secuenciación del CACTI, allí llevan a cabo la reacción de secuenciación y una vez lista, los fragmentos se migran en un ABI Prism 310 DNA Sequencer (*Applied Biosystems*). Este aparato es un secuenciador automático con capilares que recogen de la placa cada muestra independientemente y la hacen pasar por un haz de luz que excita el fluoróforo correspondiente y se talla por comparación con los fragmentos del estándar utilizando, en nuestro caso, el programa GeneMarker v2.4.0. (Figuras 3 y 4).

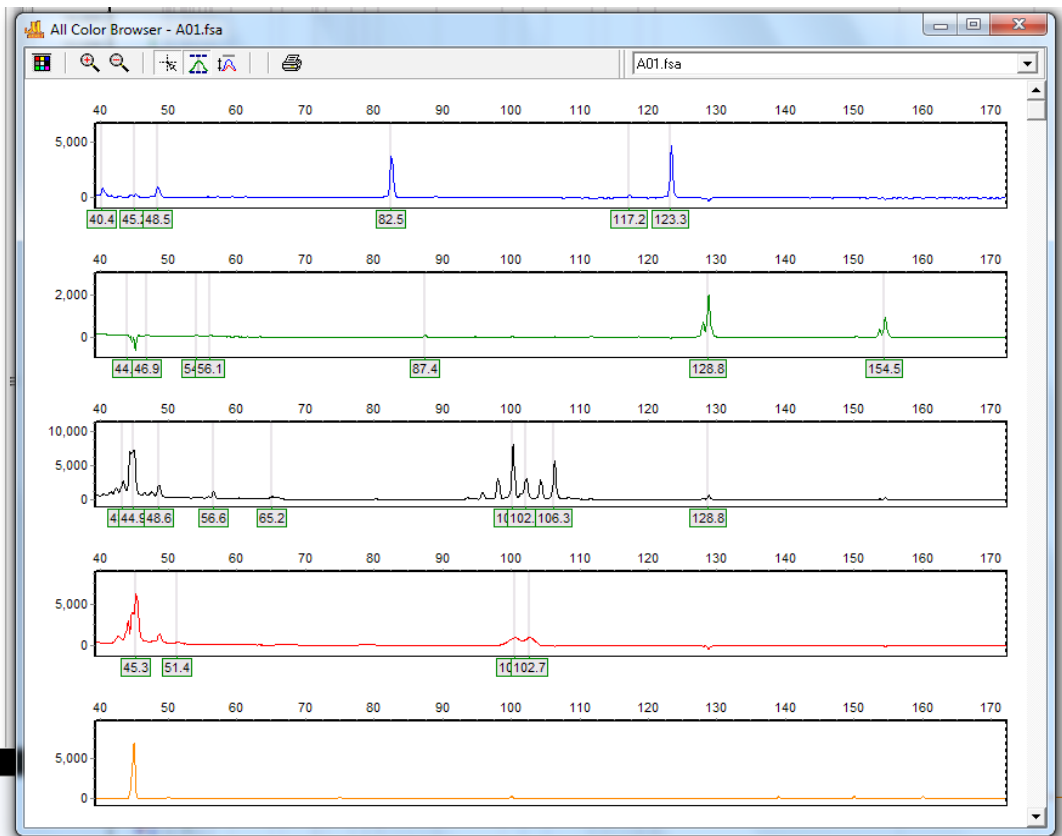


Figura 3.- Microsatélites de lengado migrados en un *ABI Prism 310 DNA Sequencer*

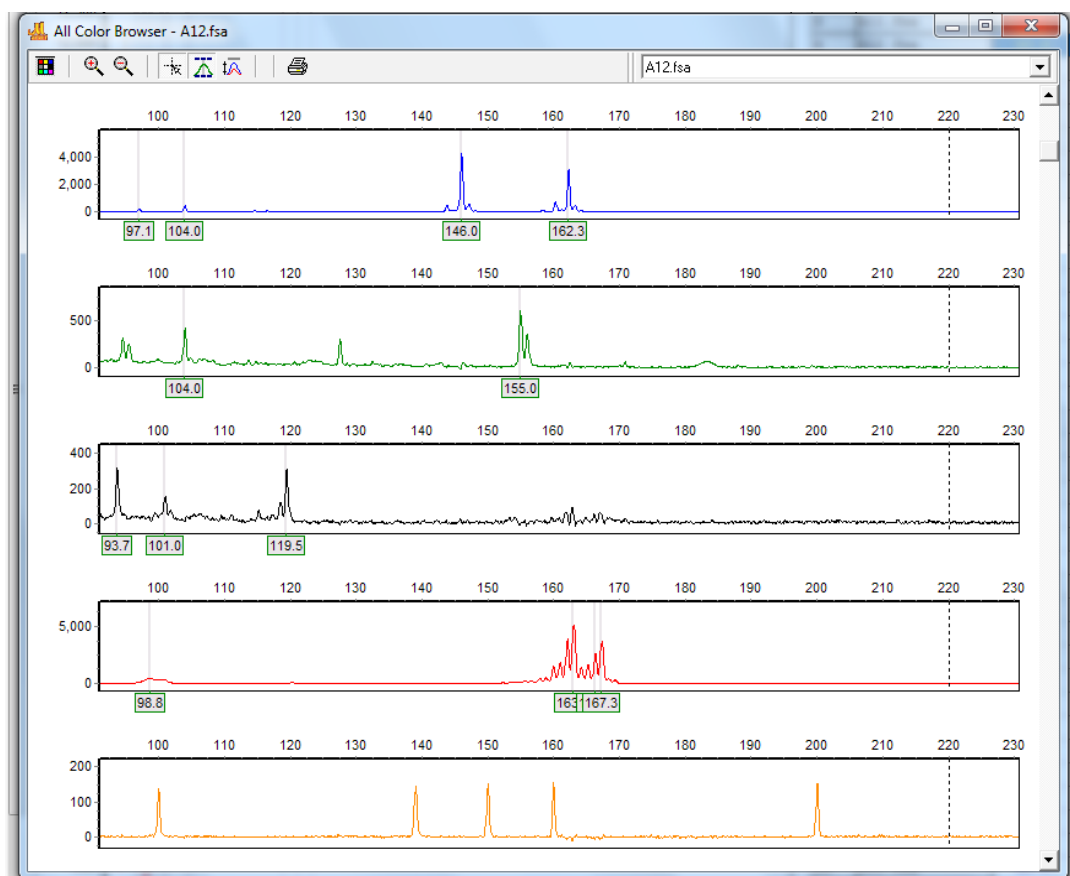


Figura 4.- Microsatélites de lengado migrados en un *ABI Prism 310 DNA Sequencer*

Una vez analizados en el secuenciador y seleccionados los alelos con el programa GeneMarker v2.4.0., los datos se registran en una hoja Excel, junto al sexo de los individuos y el año de nacimiento (Figura 5).

Sex	Year of birth	A1	A2	B1	B2	D1	D2	F1	F2
Ind1	F	2006	154	170	163	173	128	154	99
Ind2	F	2006	162	170	167	150	150	99	108
Ind3	F	2006	146	148	155	157	154	166	?
Ind4	F	2006	146	156	165	167	146	150	?
Ind5	F	2006	148	148	171	173	128	170	117
Ind6	F	2006	148	154	155	159	226	230	90
Ind7	F	2006	146	150	155	167	150	178	102
Ind8	F	2006	162	178	171	173	162	162	101
Ind9	F	2006	146	148	171	173	128	170	?
Ind11	F	2006	168	172	159	159	154	198	99
Ind13	M	2006	146	146	155	163	202	222	99
Ind14	M	2006	166	174	159	159	154	158	102
Ind15	M	2006	146	146	159	167	154	158	119
Ind16	M	2006	166	146	?	?	150	154	119
Ind17	M	2006	146	162	163	167	150	158	102
Ind18	M	2006	146	146	155	163	150	150	125
Ind19	M	2006	146	162	163	167	150	150	99
Ind20	M	2006	146	146	155	159	150	158	99
Ind21	M	2006	146	162	155	155	150	158	99
Ind22	M	2006	146	166	155	155	140	150	102
Ind1H	?	2011	162	162	167	173	150	222	102
Ind2H	?	2011	162	172	157	163	150	222	?
Ind3H	?	2011	146	172	167	173	150	154	102
Ind4H	?	2011	162	162	157	167	150	154	99
Ind5H	?	2011	146	162	167	173	218	222	99
Ind6H	?	2011	162	162	167	173	150	222	99
Ind7H	?	2011	146	162	157	163	150	154	102
Ind8H	?	2011	162	172	157	163	150	154	?
Ind9H	?	2011	146	172	163	173	150	154	102
Ind10H	?	2011	146	172	167	173	150	154	?
Ind11H	?	2011	146	172	157	163	150	222	99
Ind12H	?	2011	146	172	167	173	150	222	99
Ind13H	?	2011	146	172	157	163	150	154	99
Ind14H	?	2011	146	162	?	?	222	222	99
Ind15H	?	2011	146	162	157	163	150	154	99
Ind16H	?	2011	146	172	163	173	220	222	102
Ind17H	?	2011	?	?	?	?	228	228	117
Ind18H	?	2011	?	?	?	?	?	?	102
Ind19H	?	2011	162	162	167	173	?	?	?
Ind20H	?	2011	162	162	157	167	150	154	117
Ind21H	?	2011	146	172	163	173	150	154	97
Ind22H	?	2011	162	172	163	173	150	222	102
Ind23H	?	2011	146	162	157	167	150	154	102
Ind24H	?	2011	?	?	?	?	150	222	105
Ind25H	?	2011	?	?	?	?	150	154	?
Ind26H	?	2011	146	162	167	173	150	154	?
Ind27H	?	2011	146	162	157	163	150	222	99
Ind28H	?	2011	162	164	167	173	150	222	99

Figura 5.- Archivo de entrada en el programa PARENTE

El programa PARENTE, utiliza la información del **genotipo**: los 2 alelos de cada microsatélite, uno del padre y otro de la madre, de todos los individuos, para compararlos con los de los padres (parentales). En la figura 6 tenéis un ejemplo de la salida del programa para las posibles parejas de padres. Se selecciona aquella pareja que tiene la probabilidad más alta de ser el padre (en la figura marcado en color verde)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
1 Ind1H	Ind8	2006			1	3	Ind1	2006	0	4	1	0.0119			
2 Ind2H	Ind8	2006			0	4	Ind1	2006	0	6	0	0.2907			
3 Ind3H	Ind8	2006			1	3	Ind1	2006	0	6	1	0.003813			
4 Ind4H	Ind8	2006			1	3	Ind1	2006	0	4	1	0.01382			
5 Ind5H	Ind8	2006			0	4	Ind1	2006	0	5	0	0.2444			
6 Ind6H	Ind8	2006			0	4	Ind4	2006	1	3	1	0.001021			
7 Ind7H	Ind8	2006			1	4	Ind1	2006	0	5	1	0.002313			
8 Ind8H	Ind8	2006			1	4	Ind1	2006	0	5	1	0.06372			
9 Ind9H	Ind8	2006			0	4	Ind1	2006	0	5	0	0.2724			
10 Ind10H	Ind8	2006			1	3	Ind1	2006	0	5	1	0.002553			
11 Ind11H	Ind8	2006			1	4	Ind1	2006	0	4	1	0.0113			
12 Ind12H	Ind8	2006			1	3	Ind1	2006	0	5	1	0.01204			
13 Ind13H	Ind8	2006			1	3	Ind1	2006	0	4	1	0.01512			
14 Ind14H	Ind8	2006			0	4	Ind1	2006	0	4	1	0.01981			
15 Ind15H	Ind8	2006			0	4	Ind1	2006	0	4	1	0.04428			
16 Ind16H	Ind8	2006			1	3	Ind1	2006	0	5	1	0.002359			
17 Ind17H	Ind8	2006			0	4	Ind1	2006	0	5	0	0.3496			
18 Ind18H	Ind8	2006			1	3	Ind1	2006	0	5	1	0.002193			
19 Ind19H	Ind8	2006			1	3	Ind5	2006	0	4	1	0.00109			
20 Ind20H	Ind8	2006			1	3	Ind1	2006	0	5	1	0.001992			
21 Ind21H	Ind8	2006			0	4	Ind1	2006	0	5	0	0.3179			
22 Ind22H	Ind8	2006			1	4	Ind1	2006	0	5	1	0.002015			
23 Ind23H	Ind8	2006			1	3	Ind1	2006	0	5	1	0.001681			
24 Ind24H	Ind8	2006			1	4	Ind1	2006	0	5	1	0.01601			
25 Ind25H	Ind8	2006			1	3	Ind1	2006	0	5	1	0.001194			
26 Ind26H	Ind8	2006			0	5	Ind1	2006	0	5	0	0.192			
27 Ind27H	Ind8	2006			0	5	Ind4	2006	1	4	1	0.001585			
28 Ind28H	Ind8	2006			1	4	Ind1	2006	0	5	1	0.001212			
29 Ind29H	Ind8	2006			1	3	Ind1	2006	0	5	1	0.001008			
30 Ind30H	Ind8	2006			1	3	Ind1	2006	0	4	1	0.01253			
31 Ind31H	Ind8	2006			0	4	Ind1	2006	0	5	0	0.1941			
32 Ind32H	Ind8	2006			0	4	Ind4	2006	1	3	1	0.001117			
33 Ind33H	Ind8	2006			1	4	Ind1	2006	0	5	1	0.001837			
34 Ind34H	Ind8	2006			0	4	Ind1	2006	0	4	0	0.7326			
35 Ind35H	Ind8	2006			1	3	Ind1	2006	0	5	1	0.01066			
36 Ind36H	Ind8	2006			1	4	Ind1	2006	0	4	1	0.01034			
37 Ind37H	Ind8	2006			0	4	Ind1	2006	0	6	0	0.1915			
38 Ind38H	Ind8	2006			1	4	Ind1	2006	0	6	1	0.002538			
39 Ind39H	Ind8	2006			1	3	Ind1	2006	0	5	1	0.00176			
40 Ind40H	Ind8	2006			0	5	Ind1	2006	0	5	0	0.2828			
41 Ind41H	Ind8	2006			1	3	Ind1	2006	0	5	1	0.001767			
42 Ind42H	Ind8	2006			1	3	Ind1	2006	0	5	1	0.001482			
43 Ind43H	Ind8	2006			0	4	Ind1	2006	0	5	1	0.07268			
44 Ind44H	Ind8	2006			1	3	Ind1	2006	0	5	1	0.00993			
45 Ind45H	Ind8	2006			1	3	Ind1	2006	0	5	1	0.001392			

Figura 6.- Archivo de salida del programa PARENTE con la pareja de parentales más probable marcada en verde.

Aquellos individuos marcados en amarillo son los que presentan alguna incongruencia. El siguiente paso será revisar la lectura de genotipos para detectar posibles errores.

Para esta sesión, es necesario que dispongáis de un ordenador portátil. Lo primero que vamos a hacer es descargarnos una versión demo del programa GeneMarker v2.4.0.

La tenemos en la página web <http://www.softgenetics.com/GeneMarker.html>

Con los datos obtenidos en el CACTI, y siguiendo las instrucciones previas tenemos que leer los genotipos de los individuos que habéis muestreado. Las actividades a desarrollar en esta sesión son:

- Lectura de los genotipos obtenidos
- Preparación de la plantilla Excel para el análisis posterior
- Análisis con PARENTE, que es un programa sencillo de análisis.
- Presentación de los resultados obtenidos con los parentales

Los resultados previstos de la sesión serán:

- Genotipos revisados y analizados.
- Asignación de las puestas a los parentales.

PREPARACIÓN DE LA SESIÓN DE PRESENTACIÓN DE RESULTADOS DE LOS PROYECTOS

Una vez tengamos los resultados prepararemos una presentación de power point similar a cómo se haría en un congreso científico. Haremos ensayos de la presentación y de las preguntas posibles.

Aprenderéis lo básico para preparar una buena presentación en un congreso, organizada y clarificadora y sobre todo a enfrentarse a las preguntas.

Bibliografía

- Agulleiro, M.J., Fisiología de la reproducción del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*): Mecanismos endocrinos y aplicaciones en acuicultura, 2008. Tesis doctoral, Universitat de Valencia
- Anguis, M. V., Cañavate J. P. 2005. Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a naturally fluctuating temperature regime. *Aquaculture* 243: 133-145.
- Carazo, I.; Chereguini, O.; Huntingford, F.; Martin, I.; Norambuena, F.; Duncan, N. 2009. Observaciones del cortejo de lenguado (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) salvaje mantenido en cautividad. A: XII Congreso Nacional de Acuicultura. Madrid, 24 - 26 Noviembre, 2009
- Dinis, M.T., Ribeiro, L., Soares, F., Sarasquete, C., 1999. A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture* 176, 27–38.
- Funes, V., Zuasti, E., Catanese, G., Infante C., Manchado, M. 2004. Isolation and characterization of ten microsatellite loci for Senegal sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Molecular Ecology Notes* 4: 339-341.
- Mañanós, E. 2011, Hormonal control of reproduction in Senegalese sole. In *5th Workshop on the Cultivation of Soles* CCMAR, University of the Algarve, Faro, Portugal. 5-7 April, pp.12.
- Porta, J., Porta, J.M., Martínez-Rodríguez, G., Alvarez, M.C., 2006. Genetic structure and genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole (*Solea senegalensis*) inferred by microsatellites. *Aquaculture* 251, 46–55.
- Rasines, I., Gómez, M., Martín, I., Rodríguez, C., Mañanós, E., Chereguini, O. 2012. Artificial fertilization of Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Hormone therapy administration methods, timing of ovulation and viability of eggs retained in the ovarian cavity. *Aquaculture* 326–329, 129–135.
- Rodríguez, A. and Pascual, E. 1982. Primeros ensayos sobre utilización de la hipófisis del atún (*Thunnus thynnus*) en la maduración y puesta de *Solea senegalensis* y *Sparus aurata*. *Inv. Pesq.* 97, 1-11.
- Norambuena, F. 2009. Senegalese sole (*Solea senegalensis*) broodstock nutritional: Arachidonic Acid (20: 4n-6, ARA) and reproductive physiology. Institute for Food and Agriculture Research and Technology. Doctoral thesis. Center of Sant Carles de la Ràpita.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing forensic material. *Biotechniques* 10: 506-13.



IMPORTANCIA DE LA GENÉTICA EN ACUICULTURA

La domesticación de animales o plantas (cultivo) es el proceso por el cual una población de una determinada especie es sometida a una selección intencionada del ser humano y que, como resultado de una interacción prolongada, pierde, adquiere o desarrolla, ciertos caracteres morfológicos, fisiológicos o de comportamiento, los cuales son heredables. Su finalidad es obtener determinados beneficios de dichas modificaciones.

No cabe duda que la domesticación de especies vegetales y animales ha sido la base de los logros en agricultura y la ganadería. Sin embargo, la domesticación de especies acuícolas es aún incipiente, en particular en acuicultura marina.

A pesar de ello, los avances científicos y tecnológicos están permitiendo descifrar importantes enigmas sobre la biología del mundo acuático. Una de las disciplinas de la ciencia que puede aportar más a la domesticación de especies en acuicultura es la genética. La genética sigue unos principios similares en todas las especies. Estos principios son bien conocidos en agricultura y ganadería, por lo que su extrapolación a la acuicultura resulta crucial.

¿QUÉ APORTA LA GENÉTICA A LA ACUICULTURA?

Los avances en el estudio del ADN (con el uso de marcadores moleculares) y de la genética están permitiendo conocer con gran precisión los más secretos enigmas de los procesos biológicos de domesticación de las especies vegetales y animales.

Uno de los aspectos más interesantes de la genética es que no interfiere con ninguna de las otras disciplinas de desarrollo de la acuicultura, sino que simplemente se suma a todos los avances conseguidos por ellas.

La genética puede ayudar a tomar decisiones objetivas sobre aspectos cruciales, a la hora de iniciar y lograr el cultivo sostenible de las especies:

Constitución de los lotes reproductores

Los avances en el estudio del ADN y de la genética nos permiten conocer cómo se estructuran y distribuyen las poblaciones naturales y

las diferencias que existen entre ellas, como por ejemplo, entre poblaciones atlánticas y mediterráneas de muchas especies (como la lubina, la dorada, o el lenguado). Esto nos permite gestionar la explotación de las poblaciones naturales de una manera más sostenible.

Determinar la naturaleza y el origen de los lotes reproductores usados en acuicultura es también importante a la hora de iniciar cualquier cultivo. En este aspecto, hay empresas que usan lotes capturados en su ámbito geográfico, es decir, que su población base es la autóctona de la zona (quizás queriendo mantener una identidad de origen). Otras empresas emplean lotes de reproductores de distintos orígenes. Esta última opción puede ser interesante si se pretende mantener niveles altos de variabilidad genética del stock o si se pretende estudiar cuál de las poblaciones produce mejor rendimiento, o si, incluso, el cruce entre ellas presenta caracteres de interés.

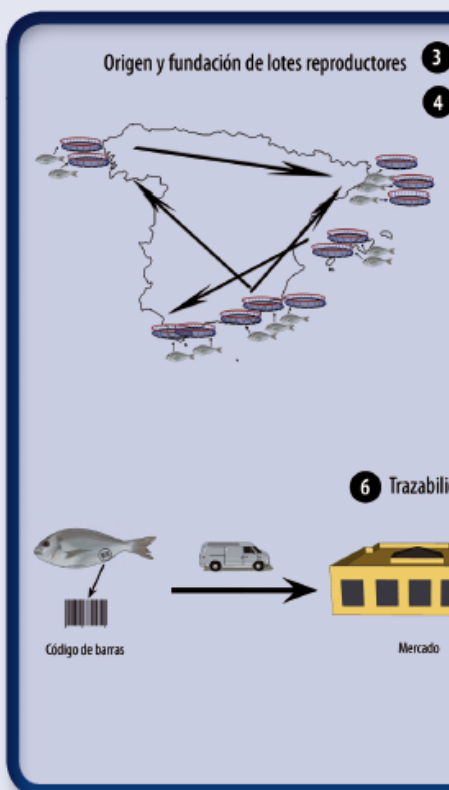
A pesar de que el uso de reproductores de distintos orígenes es una práctica habitual, es frecuente también que en el transcurrir de las generaciones se pierda la posibilidad de trazar su origen. La genética ofrece no solo la posibilidad de caracterizar adecuadamente el origen de esos lotes sino también conocer su evolución a lo largo de los sucesivos procesos productivos.

En cuanto al aspecto eco-genético del uso de poblaciones alóctonas, la genética permite evaluar y controlar el efecto de tales prácticas y su impacto sobre el medio ambiente.

Lotes salvajes vs cultivados

Los lotes reproductores en acuicultura pueden estar formados por individuos capturados del medio natural o por individuos nacidos en cautividad y seleccionados de entre la descendencia. Esta es otra decisión importante que ha de tomar el acuicultor. Sin duda, el paso hacia la domesticación supone la selección de individuos de entre la descendencia, ya que es en ella en la que vamos a ir reuniendo los caracteres de interés, y que son el objeto de la selección.

Una de las opciones que el acuicultor puede tomar es si le interesa mantener, a lo largo de las generaciones, los caracteres de su población, o si quiere mejorar determinados caracteres de interés en sus animales. La información genética permite estas dos opciones: mantener los



caracteres interesantes de sus animales y que el paso de las generaciones no los degrade, o interferir en su evolución para potenciar algunos caracteres productivos.

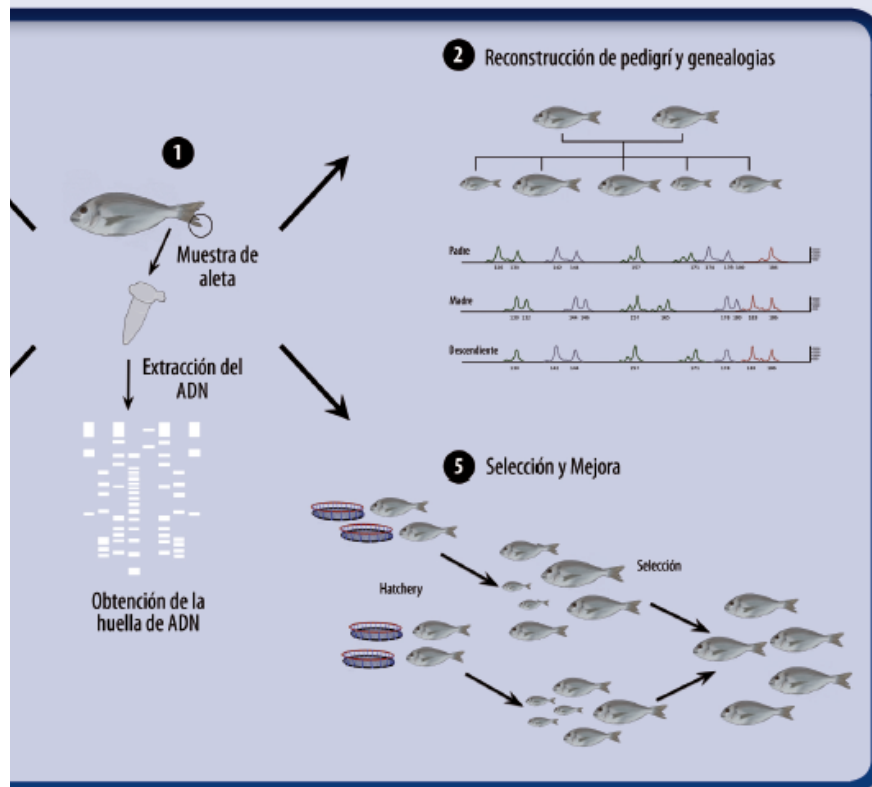
Esto último es la mejora genética, cuyo objetivo fundamental es cambiar el valor genético medio de una población para un carácter determinado, de tal forma que se aumente el beneficio económico. El carácter "tasa de crecimiento" tiene una heredabilidad alta, es decir, que si elegimos a los individuos con valores extremos para este carácter su descendencia tendrá un valor superior al de la generación inicial, por lo que en la mayor parte de los programas se selecciona este carácter. Le sigue la morfología y calidad del producto.

Una de las dificultades importantes en los programas de mejora es identificar y recoger de forma precisa los datos fenotípicos, o lo que es lo mismo, reconocer y medir los caracteres de interés de forma adecuada.

Por ello, la selección adecuada de los reproductores es una labor muy importante que debe ser tomada por personal cualificado y siguiendo los principios esenciales de la genética.

Control de la reproducción

En acuicultura, la reproducción se puede llevar a cabo de forma artificial (mezclando huevos y esperma, como en el salmón) o de forma masal, es decir, obteniendo los huevos fecundados tras las puestas en tanques de reproductores comunales (como ocurre en la mayoría de las especies piscícolas marinas). En este último caso



es imposible conocer de qué forma se produce: cuántos machos y hembras contribuyen, quiénes con quiénes, cuánto contribuye cada uno, etc.). Cuando el censo efectivo, es decir, cuando el número de reproductores es reducido, las contribuciones son muy desiguales, o con razones de sexo muy desequilibradas (caso que ocurre frecuentemente con lotes muy jóvenes o poco adaptados o al inicio del cultivo de una especie) entonces puede ser que se seleccionen de la F1 individuos emparentados; hermanos y medios hermanos. Entonces pueden producirse indeseables efectos de consanguinidad.

Conocer el proceso de reproducción resulta fundamental para la toma de decisiones en acuicultura. Eso nos permite conocer si contribuyen muchos o pocos machos (también de hembras) y ajustar la proporción de sexos. Saber si son los más jóvenes o los más adultos los que contribuyen con mayor o menor descendencia, o la calidad de las puestas, o es lo que nos permite programar el reclutamiento de reproductores.

Por tanto, la genética facilita la toma de decisiones en la gestión de los reproductores y de la producción, como por ejemplo en la distribución de los reproductores en lotes y tanques.

Trazabilidad

La identidad genética permite también hacer un seguimiento de la trazabilidad de los animales y de los productos derivados de ellos. La trazabilidad es una garantía de seguridad alimentaria y una fuente de diferenciación para las empresas. Además el análisis de ADN nos permite la identificación inequívoca de especies, y por tanto, sirve como herramienta para la lucha contra el fraude de los productos acuícolas.

Por tanto, la información genética, además de proporcionar información biológica crucial para el cultivo de una especie, puede ayudar al cultivador a plantear estrategias de producción y valoración del producto.

En resumen, la Genética puede ayudar a tomar decisiones biológicas fundamentales. De ello depende en gran parte la evolución y el control del cultivo.

Algunos estudios muestran que la razón coste-beneficio de los programas de reproducción, basados en estudios genéticos, podría ser del orden de 1:10 a 1:20. En otras palabras, que cada 1 invertido en el control genético de la reproducción reporta del orden de 10 a 20. ■

LA GENÉTICA APORTA UNA INFORMACIÓN CRUCIAL DEL PROCESO DE DOMESTICACIÓN. PUEDE AYUDARNOS EN LOS SIGUIENTES ASPECTOS

1 IDENTIFICACIÓN O GENOTIPADO DE INDIVIDUOS. La identificación o huella genética (mediante marcadores moleculares) representa una herramienta muy útil en acuicultura, donde los individuos son morfológicamente indistinguibles y se mantienen agrupados. Esta herramienta es la base de los estudios genéticos posteriores.

2 ANÁLISIS DE PEDIGRÍ (PEDIGRÍ DE ADN). Determina con total fiabilidad quiénes son los progenitores de un individuo. Ello permite conocer el patrón reproductivo de un stock particular y así ajustar las condiciones zootécnicas del cultivo o hacer un seguimiento de las familias.

3 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE STOCKS REPRODUCTORES. Este estudio permite llevar a cabo un control riguroso de los animales que componen el stock y favorecer el uso adecuado de los recursos genéticos disponibles. Con estos análisis se evitan los efectos indeseables de la consanguinidad y se maximiza la variabilidad genética del stock, que en último término representa la salud genética del mismo.

4 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE POBLACIONES NATURALES. La caracterización genética de poblaciones naturales resulta fundamental para conocer los recursos genéticos existentes en el medio natural y así poder aprovechar y conservar su riqueza genética.

5 SELECCIÓN Y MEJORA GENÉTICA. A partir de los datos de genealogías, junto con datos de los caracteres de interés, se pueden plantear programas de selección y mejora encaminados a potenciar los caracteres de interés, como crecimiento, resistencia a enfermedades, etc.

6 ESTUDIOS DE TRAZABILIDAD. Seguimiento exhaustivo de los animales y sus muestras desde su lugar de origen hasta el consumidor, lo que contribuye a mejorar la seguridad alimentaria.

Este artículo se enmarca dentro de las actuaciones recogidas en el Convenio de colaboración firmado en diciembre de 2009 entre la Fundación Observatorio Español de Acuicultura (Fundación OESA) y la Sociedad Española de Acuicultura (SEA), y más concretamente en el ámbito de actuación relativo al estrechamiento de las relaciones entre la comunidad científica y el sector empresarial a través de la figura de "hojas divulgativas".

Este artículo ha sido elaborado por **Javier Porta Pelayo**, Director I+D de AquaSolutions Biotech (jporta@uma.es).

La infografía ha sido elaborada por **Carmen Gutiérrez** (cgutierrez@fundacionoesa.es).



MIS NOTAS



MIS NOTAS



MIS NOTAS



MIS NOTAS



MIS NOTAS